

*Institut für Physiologie der Südd. Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Technische Universität München, 8050 Freising-Weihenstephan*

*und*

*\*Klinik für Geburtshilfe und Gynäkologie des Rindes  
(im Richard-Götze-Haus) der Tierärztlichen Hochschule Hannover*

## **Weiterentwicklung des Enzym-Immuntests (EIA) für Progesteron und Anwendung auf Blut-, Milch- und Speichelproben vom Rind**

Von

K.-I. ARNSTADT, E. GRUNERT\*, S. PROKOPP und B. SCHULTE\*

*Mit 7 Abbildungen*

*(Eingegangen am 13. Mai 1982)*

### **Einleitung**

Die Progesteronbestimmung ist ein wichtiges labordiagnostisches Hilfsmittel im Rahmen der gynäkologischen Untersuchung des Rindes (KARG, 8). Um die bei Anwendung radioaktiver Stoffe auftretenden Probleme mit den herkömmlichen Radio-Immuntesten (RIA) zu vermeiden, wurden Enzym-Immunteste (EIA) für die Bestimmung von Progesteron entwickelt (ARNSTADT & CLEERE, 1; KAMONPATANA u. Mitarb., 7; NAKAO, 10; ARNSTADT & CLEERE, 2). Ziel der vorliegenden Arbeit war, den von Arnstadt und Cleere entwickelten EIA für Milchfettproben zu vereinfachen und seine Anwendbarkeit bei der Untersuchung von Serumproben zu prüfen. Über einen Teil dieser Arbeiten wurde bereits in einem Kurzreferat berichtet (ARNSTADT u. Mitarb., 4).

### **Material und Methoden**

Die für den EIA und RIA verwendeten Reagenzien<sup>1</sup> sowie die Methodik wurden in der oben angeführten Arbeit von ARNSTADT und CLEERE (2) beschrieben. In Abweichung davon wurde wie

---

Herrn Professor DDr. DDr. h. c. JOHANNES BRÜGGEMANN zu seinem 75. Geburtstag gewidmet.

<sup>1</sup> Die Reagenzien für den EIA für Progesteron sind inzwischen bei der Firma BIOLAB, D-8000 München 2, Oberanger 26, erhältlich.

Für zuverlässige technische Mitarbeit danken wir Frau ERIKA BERGER, Frau MARGOT GELLERMANN und Fräulein GABRIELE SILBERBAUER.

folgt verfahren: Es wurde ein anderes Antiserum benutzt ( $K_a = 1,5 \times 10^{10} \text{ l mol}^{-1}$ ), das aber mit Hilfe des gleichen Immunogens 11  $\alpha$ -Hydroxy-progesteron-BSA durch Immunisieren von Kaninchen gewonnen wurde. Das Inkubationsvolumen wurde von 0,5 auf 0,3 ml reduziert und die Inkubationszeit im Eisbad von 1 Stunde (oder über Nacht) auf 30 Minuten verkürzt. Das Hinzufügen von Zellulose erfolgte nicht mehr extra, sondern zusammen mit den ersten 4 ml Waschlösung (1 mg Zellulose/ml). Für den Waschschrift benutzten wir  $2 \times 0,15 \text{ M NaCl}$ -Lösung. Die Zentrifugationszeiten wurden von 15 auf jeweils 5 Minuten verkürzt.

*Proben:* Zur Untersuchung kamen Serum und EDTA-Plasma von Blut aus der Vena jugularis. Zur Überprüfung eines Zyklus mit Hilfe der Progesteronbestimmung in Milchfett wurden außerdem Milchproben (Nachgemelk) gesammelt. Die Aufbewahrung der Proben bis zur Aufarbeitung erfolgte bei etwa  $-20^\circ\text{C}$ .

*Probenvorbereitung Serum und Plasma:* Die Proben wurden nach dem Auftauen zur Entfernung von denaturiertem Protein 5 Minuten in einer Tischzentrifuge bei 3000 bis 5000 rpm zentrifugiert.

0,1 ml Serum oder Plasma wurden in Szintillationsfläschchen aus Glas mit 2 ml (bi-)dest. Wasser und 4 ml n-Hexan, n-Heptan oder iso-Octan, Reinheitsgrad „zur Analyse“ (Merck, Darmstadt), 30 Minuten auf einem Horizontalschüttler (Edmund Bühler, SM) geschüttelt. Die wäßrige Phase wurde eingefroren (1 bis 2 Stunden bei  $-25^\circ\text{C}$ ), die Lösungsmittelphase in Teströhrchen aus Glas ( $14 \times 73 \text{ mm}$ ) dekantiert und das Lösungsmittel durch Verblasen mit Stickstoff oder Luft entfernt. Die mit  $^3\text{H}$ -Progesteron ermittelte Wiederfindung betrug  $80 \pm 5\%$ . Ist keine Schüttelapparatur vorhanden, kann die Extraktion im Reagenzröhrchen aus Glas erfolgen: 15 Sekunden intensiv auf einem Mixer (z. B. Vortex) schütteln, in einer Tischzentrifuge bei 2000 bis 5000 rpm bis zur Phasentrennung zentrifugieren und die Lösungsmittelphase durch Einfrieren und Dekantieren oder durch Abhebern mittels einer Pasteurpipette in Reagenzröhrchen aus Glas ( $14 \times 73 \text{ mm}$ ) übertragen. Das Lösungsmittel wird durch Verblasen mit Stickstoff oder Luft entfernt. Die mit  $^3\text{H}$ -Progesteron ermittelte Wiederfindung betrug  $65 \pm 10\%$ . Der Reagenzienleerwert im EIA sollte nicht unter 90% relativer Bindung liegen.

*Probenvorbereitung Milch:* Die Gewinnung und Extraktion von Milchfett wurde nach den Angaben von CLAUS und RATTENBERGER (6) vorgenommen. Abweichend empfiehlt sich aber die Verwendung von n-Hexan, n-Heptan oder iso-Octan statt Petroläther, das durch unspezifische Beeinträchtigung des EIA gelegentlich zu hohe Progesteronwerte verursacht hat. Die mit  $^3\text{H}$ -Progesteron ermittelte Wiederfindung betrug  $60 \pm 5\%$ .

*Speichel:* Er wurde in einer vorgehaltenen Petrischale aufgefangen, in Röhrchen umgefüllt und bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt. 0,25 und 0,5 ml Speichel wurden in der gleichen Weise wie Serum und Plasma extrahiert.

## Ergebnisse und Diskussion

Der EIA für Progesteron konnte vereinfacht werden. Die Summe der Inkubations- und Zentrifugationszeiten wurde von (mindestens) 2 Stunden 15 Minuten auf 1 Stunde 15 Minuten verkürzt. Die Dauer des EIA ergibt sich aus dieser Zeit plus „handling time“. Die Zellulosezugabe kombinierten wir mit der Zugabe der Waschlösung, wodurch ein Schritt entfällt. Der Waschpuffer (0,2 M  $\text{Na-PO}_4$ , pH 6,0) wurde ersetzt durch die leichter herzustellende 0,15 M  $\text{NaCl}$ -Lösung. Durch diese Änderungen wurde der EIA praktikabler.

Die Eichkurve dieses EIA ist im Vergleich zu dem bereits publizierten Verfahren (ARNSTADT & CLEERE, 1; ARNSTADT & CLEERE, 2) zu einem empfindlicheren Meßbereich hin verschoben (Abb. 1). Diese Modifikation des EIA wurde an Hand von Milchproben des Zyklus einer Kuh überprüft (Abb. 2). Sie lieferte hinreichende Übereinstimmung mit RIA-Werten.

Eine weitergehende Vereinfachung durch den Verzicht eines Waschschrilles hat sich nicht bewährt. Bei nur einem Waschschrift wurden zu niedrige Progesteronwerte im Vergleich zum RIA gefunden (Abb. 3). Es ist deshalb zweckmäßig, die Abtrennung des nicht gebundenen Markers weiterhin mit zwei Waschschrillen vorzunehmen.

Die Progesteronbestimmung von Serum- und Plasmaproben (Abb. 4) zeigte ebenso einen zyklischen Verlauf wie die von Milchproben (Abb. 2). Es trat jeweils ein deutliches Fluktuationsmuster auf, das hier wegen der Betonung

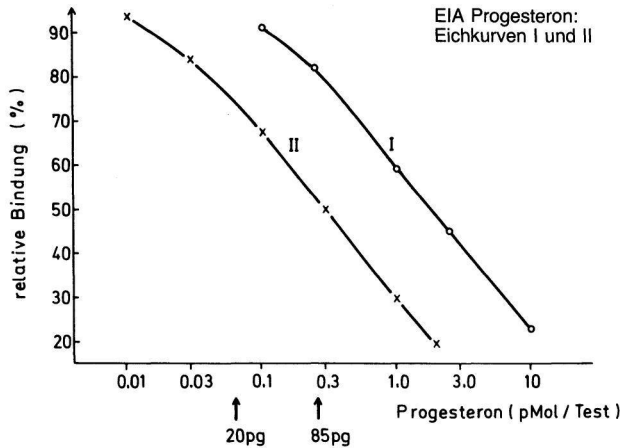


Abb. 1. Enzym-Immuntest für Progesteron. I. Eichkurve des publizierten Tests (ARNSTADT & CLEERE, 1; ARNSTADT & CLEERE, 2); II. Eichkurve des verbesserten Tests.

methodischer Aspekte nicht näher diskutiert werden soll. Bei Plasmaproben wurden mit Hilfe des EIA häufig zu hohe Werte gemessen, wie der Vergleich mit einem etablierten RIA als Kontrolle ergab. Deshalb wird im Fall des EIA für die Progesteronbestimmung in Blut als Probenmaterial nur Serum empfohlen. Progesteronmessungen bei 3 Kühen (Abb. 5) zeigten ebenfalls gelegentlich zu hohe Werte bei der Verwendung von Plasma (Nr. 1953: mit Estrumate eingeleitete Geburt; Nr. 1956: Spontangeburt; Nr. 1942: Sterilität, 6 × erfolglos besamt, Ovarialzyste). Als Ursache für die Störung bzw. unkorrekte Messung von Plasmaproben kommt deren EDTA-Gehalt in Frage. Inwieweit hier Citrat-, Oxalat- oder Heparin-Plasma besser geeignet sind, wurde bisher nicht geklärt.

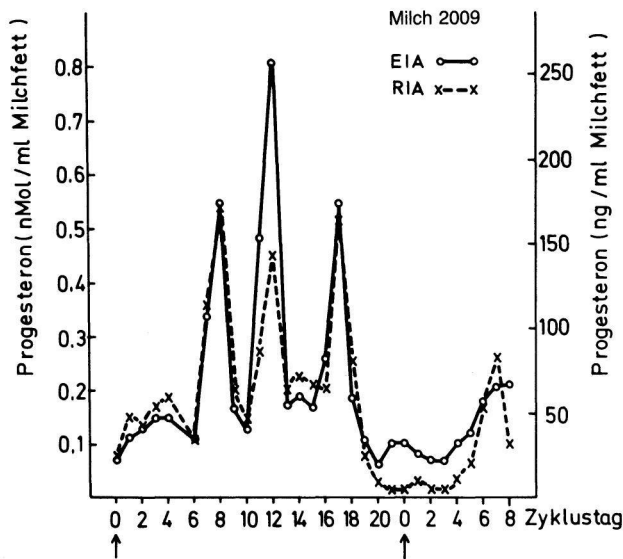


Abb. 2. Überprüfung des modifizierten EIA mit Hilfe der Progesteronbestimmung in Milchfett. Zyklus der Kuh Nr. 2009.

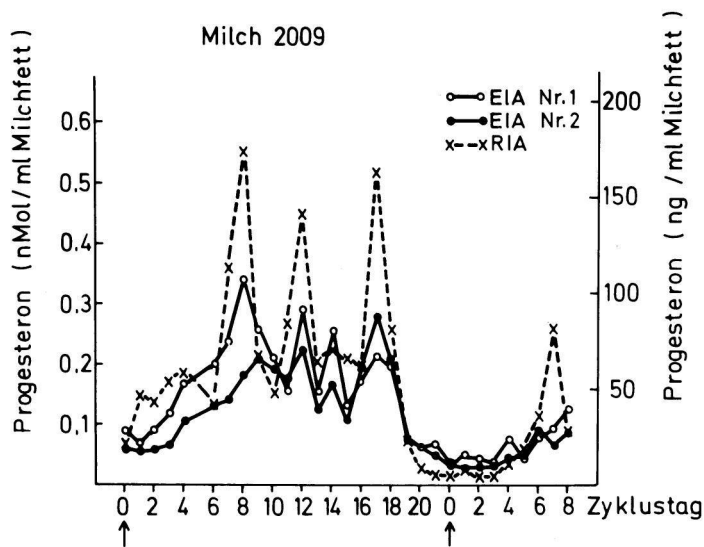


Abb. 3. Ausführung des EIA mit nur einem Waschschritt. Progesteronbestimmung in Milchfett. Zyklus der Kuh Nr. 2009.

Ein Direkttest mit Serumproben vom Rind mit Hilfe des EIA ist im Gegensatz zu humanen Serumproben (ARNSTADT & BERG, 3) nicht möglich, auch nicht nach versuchter Inaktivierung von Steroid-bindenden Proteinen durch Erhitzen (30 Minuten, 80 °C). Da einerseits ein Direkttest wünschenswert ist, um durch Vermeidung der Lösungsmittelextraktion die Progesteronbestimmung zu beschleunigen, andererseits bisherige Direktbestimmungen mit Milch wegen der Störungen durch Milchfett als unzuverlässig angesehen werden, wurde Speichel als Probenmaterial geprüft.

Beim Menschen ist die Bestimmung von Steroiden im Speichel möglich (ARNSTADT & BERG, 3; WALKER u. Mitarb., 12). Speichel vom Rind hätte den Vorteil, daß keine Störung des Tests durch Fett und die Probenentnahme unabhängig von Laktation oder Blutentnahme erfolgen kann. Wegen des unterschiedlichen Speichelflusses der Wiederkäuer schwanken erwartungsgemäß die Progesteronkonzentrationen während eines Tages (Abb. 6). Um eine reproduzierbare Probenentnahme zu finden, wurde die Progesteronmenge in Korrelation zu Fütterung, Ruhe bzw. Wiederkäuen und Melken untersucht. Die nicht streng korrelierten Werte sind niedrig während der Fütterung und hoch während der Ruhe und des Wiederkäuens. Zum Melkvorgang besteht keine Korrelation. Bei 3 untersuchten Zyklen, von denen ein Beispiel in Abbildung 7 dargestellt ist, ließen die starken Schwankungen keine Korrelation der Progesteronwerte zum Zyklusgeschehen zu. Unsere Befunde über Progesteron in Rinderspeichel stehen im Einklang mit Erfahrungen von SHEMAESH (11).

Ziel einer Weiterentwicklung des EIA wäre, Bedingungen für einen Direkttest mit Milch zu finden, unter denen eine korrekte Aussage trotz unterschiedlichen Fettgehaltes möglich ist. Da man allgemein wegen der störenden Bestandteile einer biologischen Probe das in den Test eingesetzte Volumen so klein wie möglich halten sollte, kann die erhöhte Empfindlichkeit des hier beschriebenen EIA nützlich oder gar Voraussetzung sein für die Entwicklung eines solchen Direkttests. Diese Annahme konnte inzwischen mit der Ausarbeitung einer Direktbestimmung bestätigt werden, worüber an anderer Stelle berichtet wird (ARNSTADT & SCHMIDT-ADAMOPOULOU, 5).

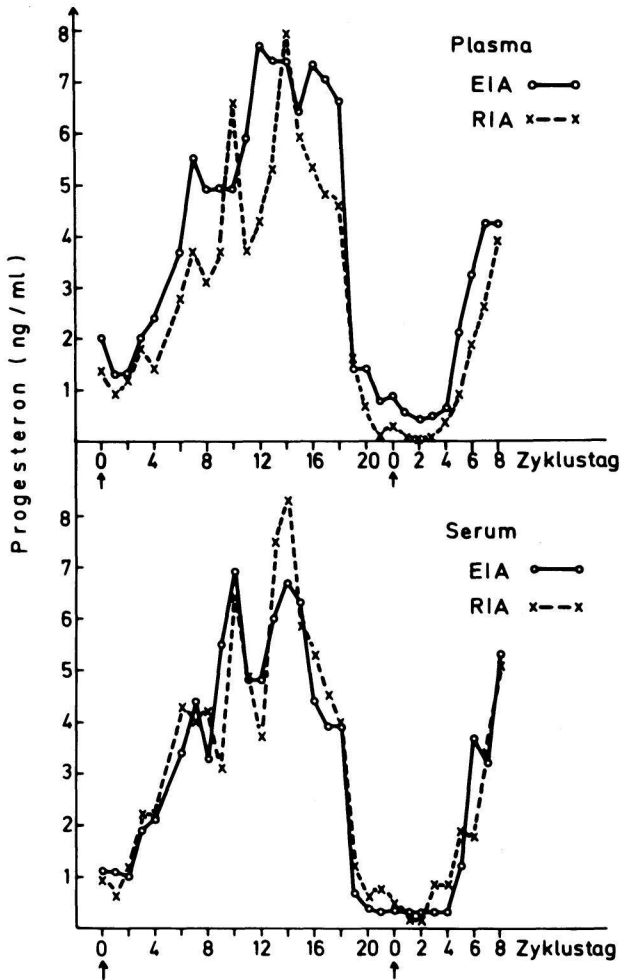


Abb. 4. Enzym-Immuntest für Progesteron mit Plasma- und Serumproben nach Extraktion. Zyklus der Kuh Nr. 2009.

### Zusammenfassung

Der Enzym-Immuntest für Progesteron wurde sowohl empfindlicher, als auch praktikabler gestaltet. Der modifizierte EIA zeigte bei der Anwendung auf Rinderserum und Milchfettproben eine gute Übereinstimmung mit Progesteronwerten, die mit Hilfe des RIA ermittelt wurden. Die Bestimmung von Progesteron im Speichel vom Rind dagegen ist nicht möglich.

### Summary

#### Improvement and application of an enzyme-immunoassay (EIA) for progesterone

The enzyme-immunoassay for progesterone was improved to become more sensitive and more practical. With milkfat samples and in the first application to bovine serum the modified EIA has a good correlation with values determined by RIA. The determination of progesterone in bovine saliva, however, is not possible.

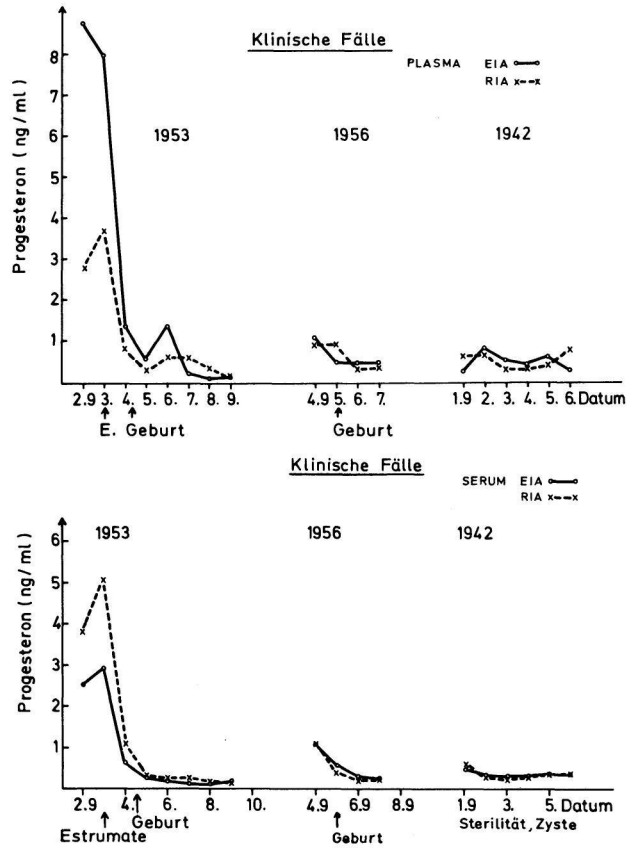


Abb. 5. Progesteronbestimmung in Plasma und Serum von Tieren ante und post partum bzw. mit Ovarialzysten.

### Résumé

#### Nouveau développement et utilisation de l'Enzyme-Immuno-Essai (EIA) pour la progestérone.

L'Enzyme-Immuno-Essai pour la progestérone est devenu plus sensible et plus praticable. EIA modifié a montré une bonne corrélation avec les valeurs de progestérone obtenue avec RIA en utilisant des échantillons de graisse du lait et pour la première fois du sérum bovin. La détermination de progestérone dans la salive du bovin n'est par contre pas possible.

### Resumen

#### Desarrollo ulterior de la prueba enzimo-inmune (EIA) para la progesterona y su aplicación en muestras de sangre, leche y saliva de vacunos

La prueba enzimo-inmune para identificar la progesterona se tornó más sensitiva y más praticable. Mostraba la EIA modificada, al ser empleada con suero bovino y muestras de grasa de leche, una correlación buena con los valores obtenidos con RIA. Sin embargo, no resulta posible la determinación de la progesterona en la saliva vacuna.

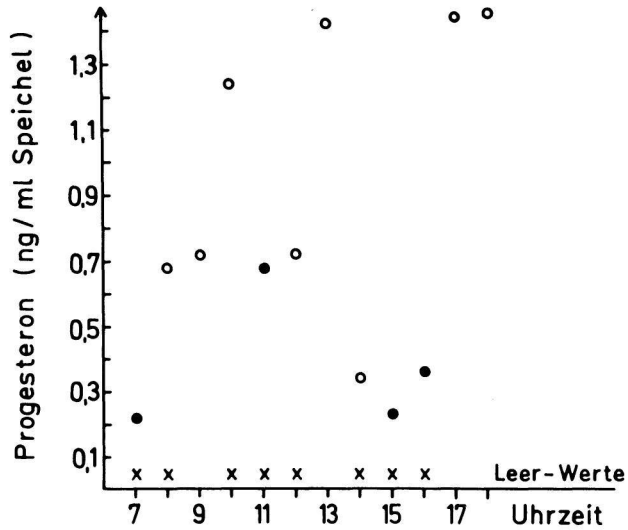


Abb. 6. Progesteronkonzentration im Speichel einer Kuh (Olga, Zyklustag 10). Bestimmung nach Extraktion mit Hilfe des EIA. ● Speichelentnahme während der Futteraufnahme. ○ Speichelentnahme vom ruhenden oder wiederkäuenden Tier.

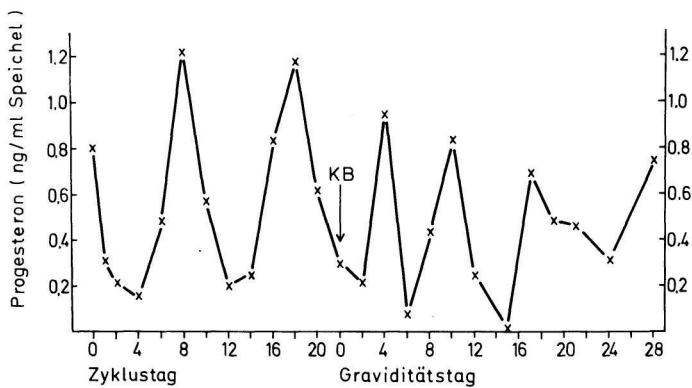


Abb. 7. Progesteronbestimmung mit Hilfe des EIA in Speichalextrakten während des Zyklus und der frühen Trächtigkeit einer Kuh.

### Literatur

1. ARNSTADT, K.-I., and CLEERE, W. F., 1979: Enzyme-Immuno-assay for progesterone applied to milk samples. *Proceed. of the Conference "Applications of Radioimmunoassays and Related Methods in Animal Science"* Warschau 1979, S.25, Hrsgb. R. Stupnicki & B. Barcikowski, Zesz. probl. Post Nauk Poln. No.261 PWN, Warszawa.
2. ARNSTADT, K.-I., and CLEERE, W. F., 1981: Enzyme-Immunoassay for determination of progesterone in milk from cows. *J. Reprod. Fert.* 62, 173—180.
3. ARNSTADT, K.-I., and BERG, D., 1981: Sensitive Enzyme-Immunoassay for progesterone in human plasma and saliva. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 19, 602—603.
4. ARNSTADT, K.-I., E. GRUNERT und B. SCHULTE, 1981: Die Weiterentwicklung und Anwendung des Enzym-Immuntests (EIA) für Progesteron. *Zuchthygiene* 16, 78 (Abstrakt).
5. ARNSTADT, K.-I., and B. SCHMIDT-ADAMOPOULOU, 1982: Direct Enzyme-Immunoassay for determination of progesterone in milk from cows, submitted.
6. CLAUS, R., and E. RATTENBERGER, 1979: Improved method for progesterone determination in milk fat. *Brit. vet. J.* 135, 448—453.
7. KAMONPATANA, M., D. F. M. VAN DE WIEL, W. KOOPS, D. LEENANURUKSA, CH. NGRAMSURIYARAJ, and S. USANAKORNKUL, 1979: Oestrus control and early pregnancy diagnosis in the swamp buffalo: comparison of enzyme-immunoassay and radioimmunoassay for plasma progesterone. *Theriogenology* 11, 399—409.
8. KARG, H., 1981: Praktische Bedeutung der Hormonanalytik unter besonderer Berücksichtigung der Herdenbetreuung. *Zuchtwahl und Besamung* 95, 10—14.
9. KARG, H., 1981: Physiological impact on fertility in cattle with special emphasis on assessment of the reproductive function by progesterone assay. *Livestock Production Science* 8, 233—246.
10. NAKAO, T., 1980: Practical procedure for enzyme immunoassay of progesterone in bovine serum. *Acta endocrin.* 93, 223—227.
11. SHEMESH, M., 1980: Persönliche Mitteilung.
12. WALKER, R. F., D. N. WILSON, G. F. READ, and D. RIAD-FAHMY, 1980: Assessment of testicular function by the radioimmunoassay. *Intern. J. Androl.* 3, 105—120.

Adresse der Autoren: Institut für Physiologie der Südd. Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Technische Universität München, D-8050 Freising-Weihenstephan.